

瞿静雯,王 健,李拥军,等. 绵羊卵母细胞成熟培养的研究进展[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):22-25.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.005

绵羊卵母细胞成熟培养的研究进展

瞿静雯,王 健,李拥军,王 强,尹修远

(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室,江苏扬州 225009)

摘要:卵母细胞培养是胚胎工程的重要组成部分,是体外受精、胚胎移植及转基因技术的基础。不断完善卵母细胞成熟培养条件,可以大大提高卵母细胞体外成熟的质量,充分发挥绵羊卵母细胞的繁殖潜力。绵羊卵母细胞体外成熟培养受到多种因素的限制,其中培养液成分包括基础培养基、血清、激素、卵泡液、生长因子、抗氧化物和维生素等 6 个方面。笔者对绵羊卵母细胞成熟培养的培养液成分相关研究进展进行综述,旨在提高绵羊卵母细胞体外成熟培养的质量和促进体外胚胎技术研究。

关键词:绵羊;卵母细胞;成熟培养;研究进展;培养液成分

中图分类号:S826.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)10-0022-04

卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation,简称 IVM)是指从卵巢卵泡腔中采集未成熟的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes,简称 COCs),在体外成熟培养液中,经过成熟培养后,排出第一极体的过程^[1]。卵母细胞的体外成熟、体外受精(*in vitro* fertilization,简称 IVF)、胚胎移植技术(embryo transfer,简称 ET)及转基因技术(cloning and gene transfer)在提高母畜繁殖力、加快品种改良、缩短世代间隔等繁殖相关领域具有广泛的应用前景^[2]。卵母细胞体外成熟培养的品质是决定动物体外人工辅助生殖技术成败的关键因素之一。研究表明,卵母细胞体外成熟是一个复杂的过程,除了内源性激素(卵泡刺激素、促黄体素和雌二醇)的表达调控之外^[3],成熟培养液中外源性的分子也是影响卵母细胞成熟发育的重要因素^[4]。Wei 等研究发现,在体外成熟培养过程中,马绒毛膜促性腺激素(equine chorionic gonadotropin,简称 eCG)提高了绵羊卵母细胞的成熟率,减少了卵母细胞的凋亡,并增强了卵泡刺激素受体(follicle-stimulating hormone receptor,简称 FSHR)、促黄体素受体(luteinizing hormone receptor,简称 LHR)和促性腺激素释放激素受体(gonadotropin-releasing hormone receptor,简称 GnRHR)的表达,从而促进卵母细胞体外成熟培养^[5]。Anchordoquy 等研究发现,将血管内皮生长因子在培养 0~3 h 和半胱胺在培养 4~24 h 时连续加入成熟培养液中,提高了牛卵母细胞质的成熟质量和体外培养的效率,促进了牛卵母细胞的发育能力;当卵母细胞在同时含有血管内皮生长因子和半胱胺的卵母细胞成熟液中培养 24 h 后,虽然提高了牛卵母细胞中谷胱甘肽(GSH,具有清除代谢过程中产生的自由基的作用,防止胚胎因过氧化作用而导致早衰)的含量,但对胚胎发育具有不利影响^[6]。卵母细

胞的体外成熟受多方面因素的作用,如季节、年龄、卵母细胞的来源、培养液成分等诸多要素。虽然关于绵羊卵母细胞体外培养的报道较多,但是与体内卵母细胞正常成熟相比,卵母细胞的体外成熟还存在一些问题,比如质量较差、受精率较低、早期胚胎发育停滞等。因此,如何提高绵羊卵母细胞体外培养的质量成为促进体外胚胎技术的关键之一。本研究就绵羊卵母细胞体外成熟培养的培养液成分进行综述,旨在为提高绵羊卵母细胞体外培养的质量及其在动物人工辅助生殖领域的广泛应用提供理论参考。

1 基础培养液对绵羊卵母细胞体外成熟培养的影响

目前,国内外研究者多选择合成输卵管液(synthetic oviduct fluid,简称 SOF)和 TCM199(tissue culture medium 199)作为基础培养液进行绵羊卵母细胞体外成熟培养,为卵母细胞的成熟提供营养因子,成熟率可达 79%^[7]。SOF 是一种成分简单的培养液,常应用于早期胚胎的培养,主要由几种常规的无机盐类和能量底物组成,如乳酸、丙酮酸钠、葡萄糖,使用时须要同时添加氨基酸。TCM199 是一种成分复杂的培养液,除了含有几种常规的无机盐类和能量底物外,还含有维生素、嘌呤、核苷酸及微量表面活性剂等成分^[8-9]。体外受精后的胚胎培养需要添加卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone,简称 FSH)和促黄体素(luteinizing hormone,简称 LH)。目前,绵羊卵母细胞体外成熟体系中以 TCM199 应用较为广泛^[10]。此外,为了提高绵羊卵母细胞体外培养的成熟率,通常还要在基础培养液中添加血清、激素、卵泡液、生长因子、抗氧化物等。

2 血清对绵羊卵母细胞体外成熟培养的影响

血清对哺乳动物卵母细胞的成熟具有一定的促进作用,它含有卵母细胞生长所需的多种氨基酸、维生素、激素、生长因子和抗氧化物质等。在卵母细胞成熟液中添加血清,能为颗粒细胞提供营养成分,防止卵母细胞卵黄膜硬化,保持卵母细胞的完整性,促进卵母细胞成熟。目前常用于卵母细胞成熟培养液中的血清有胎牛血清(fetal bovine serum,简称

收稿日期:2018-10-07

基金项目:江苏现代农业产业技术体系建设项目(编号:JATS[2018]304)。

作者简介:瞿静雯(1993—),女,江苏泰州人,硕士研究生,研究方向为遗传育种与繁殖。E-mail:1365618714@qq.com。

通信作者:李拥军,博士,教授,博士生导师,研究方向为动物繁殖学和养羊生产学。E-mail:liyong@yzu.edu.cn。

FBS)、新生牛血清、发情牛血清和牛血清白蛋白。研究表明,由于胎牛还未与外界接触,胎牛血清中含有抗体、补体等,对细胞有害的成分最少,所以胎牛血清优于牛血清白蛋白;由于发情牛血清中含有一定浓度的激素和促成熟因子,能促进卵母细胞的成熟,所以发情牛血清优于胎牛血清^[11]。有研究发现,在卵母细胞成熟液中添加 10% FBS 和 20% FBS,并补充以丙酮酸、谷氨酰胺、促黄体素、促卵泡素和雌二醇(E_2),在卵母细胞成熟率方面没有显著差异(82%与79%);但是,在含有 20% FBS 培养液中发育成熟的卵母细胞受精后,继续使用含有 20% FBS 的发育液培养时,其卵裂率显著高于其他试验组,发育至桑椹胚、囊胚期的早期胚胎数也高于其他组^[10]。

3 激素对绵羊卵母细胞体外成熟培养的影响

卵母细胞成熟液中常添加的激素有 FSH、LH 和 E_2 。FSH 和 LH 是参与卵泡发生最主要的蛋白质激素,与颗粒细胞、内膜细胞上的受体结合并激活环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate,简称 cAMP)系统,导致类固醇激素的合成,尤其是雌二醇的合成,从而促进卵泡的卵母细胞发育和排卵。FSH 促进卵泡的发育,在生长期的大部分时间内,卵母细胞停滞在前 I 期,需要 LH 刺激形成排卵峰,导致颗粒细胞中 cAMP 的含量上升,卵母细胞中 cAMP 含量下降,减数分裂重启^[11]。在成熟培养液中添加适当浓度的 LH, LH 受体受到刺激后,外层颗粒细胞表达 RNA 编码的表皮生长因子样蛋白,从而实现 LH 信号从外层向内层的转化^[12],抑制次黄嘌呤介导的分裂停滞,而诱导减数分裂重启,促进卵母细胞的成熟。Hobbs 等研究发现,在卵母细胞培养液中同时添加 10 $\mu\text{g/mL}$ FSH 和 10 $\mu\text{g/mL}$ LH 提高了卵母细胞的成熟率,常和 1 $\mu\text{g/mL}$ E_2 同时添加以促进卵母细胞质的成熟^[13]。马绒毛膜促性腺激素(eCG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)一样,具有 FSH 和 LH 的双重作用,对 FSHR 和 LHR 具有高度亲和力。研究表明 eCG 能提高非繁殖季节奶牛和母羊的生殖能力、排卵数和妊娠率^[14-16]。Wei 等在兰州大尾绵羊卵母细胞培养液中添加 20 $\mu\text{g/mL}$ eCG,与添加 10 IU/mL FSH 相比,提高了卵母细胞成熟率(从 51.7%至 48.5%),减少了卵母细胞的凋亡(从 19%至 20.6%)^[15]。

4 卵泡液对绵羊卵母细胞体外成熟培养的影响

卵泡液(follicular fluid,简称 FF)在体内的作用机制尚未被阐明,目前,对于卵泡液能否作为卵母细胞成熟培养的添加物,观点尚不一致。多数研究表明,卵泡液中存在类固醇激素、促性腺激素和生长因子,包括胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1,简称 IGF-I)和表皮生长因子(epidermal growth factor,简称 EGF),能够提高质核成熟的同步化,影响卵母细胞的成熟、受精以及胚胎的发育^[17-18]。有研究报道,类固醇激素的刺激作用对于卵母细胞的成熟收效甚微,有的还起到轻微的抑制作用^[19]。卵泡液中的促减数分裂甾醇(follicular fluid-meiosis-activating sterol,简称 FF-MAS)胆固醇合成的中间产物,被认为是促进卵母细胞成熟的候选物。然而,有研究发现,FF-MAS 与自发或促性腺激素诱导卵母细胞成熟的时间不同,说明胆固醇很可能不是主要促进卵母细胞成熟的因子^[20]。Germoush 等研究了绵羊卵

泡液(sheep follicular fluid,简称 SFF)对卵母细胞体外成熟和体外受精后早期胚胎发育的影响,结果表明,在成熟液中添加 10% 和 20% 的 SFF,对成熟率和卵裂率没有显著影响,而在添加 40% SFF 的成熟液中,卵母细胞成熟率和卵裂率较添加之前显著提高;与其他试验组相比,在成熟液中添加 10% SFF,显著提高了囊胚的发育率^[21]。然而,也有研究者认为,40% 的卵泡液对卵母细胞的成熟具有抑制作用,卵泡液对体外卵母细胞成熟的影响还有待进一步研究。

5 生长因子对绵羊卵母细胞体外成熟培养的影响

卵泡卵母细胞的发育是由促性腺激素和生长因子协同调节的。体外卵母细胞成熟培养液中对卵母细胞的成熟和胚胎早期发育具有促进作用的生长因子有表皮生长因子、转化生长因子、胰岛素样生长因子和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等。

5.1 表皮生长因子

表皮生长因子是具有多功能效应的促细胞分裂因子,能刺激多种细胞的增殖,使处于 G_0 期的细胞进入 S 期。研究已证明表皮生长因子能将卵泡边缘的 LH 信号传递给 COCs,是排卵信号传导中的重要组成部分。最新研究发现,EGF 信号下调体细胞信号 3',5'-环鸟嘌呤单磷酸,提供减数分裂诱导信号,引起减数分裂的恢复,同时能促进卵母细胞成熟过程中蛋白质的合成,从而提高卵母细胞的质量和受精能力^[22-23]。EGF 由黄体 and 内膜细胞产生,通过介导有丝分裂蛋白激酶 3 和 1(MAPK3/1)途径,从而中断 cAMP 的运输,导致分裂成熟复始,促进卵母细胞的体外成熟^[24]。尹耀学等研究发现,在卵母细胞体外培养液中添加 EGF 可以诱导卵母细胞体外成熟^[25]。

5.2 转化生长因子

转化生长因子是一组具有生物活性的多肽类物质,这些多肽因子能诱发原本贴壁生长的正常细胞出现可逆性转化的表型以促使细胞生长,也能诱导指示细胞产生可逆转化。主要分为 α 型 TGF 和 β 型 TGF,相关结果表明,TGF- α 能改善卵母细胞成熟的质量和受精后的发育潜能,然而其确切的机制还不完全清楚^[10]。TGF- β 是一种多功能的细胞活化素并且具有多种形式,它们属于一个大的基因家族,在细胞生长方面具有多种作用,比如分化、迁移以及细胞外基质的形成、细胞表面分子表达的调控等^[26]。最近 TGF- β 在卵母细胞成熟过程中的传播途径成为研究的热点,TGF- β 在结构和功能上调节 EGF,协同作用使减数分裂恢复,而刺激卵母细胞的成熟。陈静波等研究表明,在成熟培养液中添加 1 ng/mL TGF- β 能促进猪体外卵母细胞核和裸卵的成熟^[27]。

5.3 胰岛素样生长因子

胰岛素样生长因子是一种作用于多种组织和器官,具有多种生理功能的多效性营养因子多肽,能增加葡萄糖和氨基酸的吸收,抑制蛋白质降解,刺激各种细胞的增殖和分化^[28]。有研究表明,IGF-I 可以诱导颗粒细胞 LH 受体的表达,维持卵泡的生长,抑制卵泡闭锁,能促进卵母细胞体外成熟和体外受精^[29]。赵晓娥等研究表明,在山羊卵母细胞培养液中添加 IGF-I,可以显著提高卵母细胞成熟率,尤其是 EGF 和 IGF-I 联合使用时^[30]。Bezerra 等研究发现,在培养液中添

加 100 ng/mL IGF - I 能够促进原始卵泡的激活和细胞增殖并且通过 PI3K/AKT 途径减少 DNA 碎片的产生^[31]。

5.4 血管内皮生长因子

血管内皮生长因子是一种特殊的细胞分裂剂和潜在的血管分化因子,可以促进内皮细胞增生,促进细胞迁移,抑制细胞凋亡,提高血管和微血管对大分子物质的通透性^[32]。它在哺乳动物生殖调控中也起重要作用,能够显著提高卵丘细胞的扩散和卵母细胞的核质成熟,促进卵母细胞的体外成熟。宋凯等研究了 VEGF 对绵羊卵母细胞体外成熟的影响,结果表明,在含有胎牛血清(fetal bovine serum,简称 FBS)的体系中添加 VEGF 能有效促进卵母细胞体外成熟和胚胎的早期发育,最适添加量为 5 ng/mL^[33]。Araújo 等的研究表明,100 ng/mL VEGF 可以代替 10 ng/mL EGF + 50 ng/mL IGF - I 在体外卵母细胞成熟的过程中恢复减数分裂,调控卵母细胞的成熟^[34]。但有关 VEGF 促进卵母细胞的成熟和早期胚胎发育的作用机制还有待进一步研究。

6 抗氧化物和维生素对绵羊卵母细胞体外成熟培养的影响

卵母细胞在体外培养的过程中,由于细胞代谢产生过量的活性氧(reactive oxygen species,简称 ROS),会导致线粒体功能障碍,损害 DNA,发生脂质过氧化反应和蛋白质的氧化变化,抑制受精率,引起细胞死亡^[35]。因此,许多研究人员在卵母细胞成熟培养液和胚胎发育液中加入了多种抗氧化剂,以减少 ROS 对胚胎发育过程中的有害影响,如低分子量的含巯基化合物包括 β - 巯基乙醇、半胱氨酸、胱氨酸和半胱胺^[36]。谷胱甘肽(GSH)是一种存在于卵母细胞中的天然抗氧化剂,并且在不同发育阶段 GSH 表达量也发生变化,能够清除对细胞发育有损害作用的过氧化物。半胱胺是能够使胱氨酸转化为半胱氨酸的一种低分子量巯基化合物,半胱氨酸能够促进卵母细胞内 GSH 的合成^[37]。郭洪等的研究表明,在绵羊卵母细胞成熟液中添加 100 μ mol/L 半胱氨酸能提高卵母细胞核质成熟的能力^[38]。

7 小结与展望

卵母细胞成熟包括旁分泌、自分泌和自分泌体等一系列复杂的过程,所涉及的信号通路最终都转化为对 cAMP 的调控。在对海星、爪蟾、哺乳动物等不同物种的研究中,在卵母细胞温育过程中添加 cAMP 类似物或刺激 cAMP 产生的药理学物质,导致卵母细胞内 cAMP 含量升高^[39],现已确认,高浓度的 cAMP 会抑制减数分裂的进行,使其停留在减数分裂休止期。所以卵母细胞内 cAMP 浓度的下降,是减数分裂恢复的前提。磷酸二酯酶(phosphodiesterase,简称 PDE)是一种在卵巢中呈区域化分布的、专门负责第二信使 cAMP 和环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate,简称 cGMP)的酶^[40-41]。PDE3 家族和同工酶 PDE4 家族共同调节 cAMP 的平衡,Tsafiri 等通过原位杂交方法,利用特异性标记的 PDE3、PDE4 异构体探针,结果发现 PDE3 主要在卵母细胞内表达,PDE4 更多是在颗粒细胞中表达,但是由 PDE3 介导的卵母细胞内 cAMP 浓度的下降和由 PDE4 介导的颗粒细胞中 cAMP 浓度的上升,二者之间是否存在因果关联还值得进一步探究^[42]。

外胚胎技术由于能够迅速扩繁,提高母羊的繁殖力,从而

在生产上可以得到广泛应用。绵羊卵母细胞的体外成熟是受多种因素共同作用完成的,如培养温度、培养时间、培养液成分等,任何一种因素最终都是通过上调磷酸二酯酶的活性,平衡卵母细胞内 cAMP 的浓度,使减数分裂恢复,促进卵母细胞的成熟。因此,筛选出最适添加成分的组合是至关重要的。而培养出高质量的绵羊卵母细胞是体外胚胎技术的前提。在未来的研究中,借助高通量技术在基因组学、转录组学、蛋白质组学和表观遗传学等领域深入研究卵母细胞生长和成熟的调控机制是提高卵母细胞培养质量的发展趋势。

参考文献:

- [1] de Vos M, Smits J, Thompson J G, et al. The definition of IVM is clear - variations need defining [J]. Human Reproduction, 2016, 31 (11): 2411 - 2415.
- [2] Guo H, Wang Q, Li Y, et al. Overexpression of CDC25C affects the cell cycle of ovarian granulosa cells from adult and young goats [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2018, 31: 17 - 23.
- [3] 陆会宁, 齐燕姣. 影响绵羊卵母细胞体外成熟因素研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, 2013 (9): 147 - 150.
- [4] Richani D, Gilchrist R B. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence [J]. Human Reproduction Update, 2018, 24 (1): 1 - 14.
- [5] Wei S C, Gong Z D, Zhao H W, et al. Equine chorionic gonadotropin influence on sheep oocyte *in vitro* maturation, apoptosis, and follicle - stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor expression [J]. Genet Mol Res, 2016, 15 (4): 1 - 12.
- [6] Anchordoquy J M, Anchordoquy J P, Testa J A, et al. Influence of vascular endothelial growth factor and Cysteamine on *in vitro* bovine oocyte maturation and subsequent embryo development [J]. Cell biology international, 2015, 39 (10): 1090 - 1098.
- [7] 朱肖亭, 辛晓玲, 王鸿周, 等. 绵羊卵母细胞体外成熟研究 [J]. 河南畜牧兽医 (综合版), 2016, 37 (5): 9 - 11.
- [8] 吴中红, 邢凤英, 刘国世, 等. NCSU23、SOF 及氨基酸对猪孤雌激活胚胎体外发育的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11 (5): 511 - 515.
- [9] van Wagtenonk - de Leeuw A M, Mullaart E, de Roos A P W, et al. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring [J]. Theriogenology, 2000, 53 (2): 575 - 597.
- [10] 陆会宁, 齐燕姣. 影响绵羊卵母细胞体外成熟因素研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, 2013 (9): 147 - 150.
- [11] Conti M, Andersen C B, Richard F J. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis I [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1998, 145 (1/2): 9 - 14.
- [12] Park J Y, Su Y Q, Ariga M, et al. EGF - like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle [J]. Science, 2004, 303 (5658): 682 - 684.
- [13] Hobbs R J, Comizzoli P, Howard J G, et al. Absence of seasonal changes in FSHR gene expression in the cat cumulus - oocyte complex *in vivo* and *in vitro* [J]. Reproduction, 2012, 144 (1): 111 - 122.
- [14] Uslu B A, Tasal I, Gulyuz F, et al. Effects of oestrus synchronisation using melatonin and norgestomet implants followed by eCG injection upon reproductive traits of fat - tailed Morkaraman ewes during

- suckling, anoestrus season[J]. Small Ruminant Research, 2012, 108 (1/2/3): 102–106.
- [15] Hashim N H, Sembiring M. Time of PMSG administration; effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes[J]. Biomedical Research, 2013, 24(1): 7–12.
- [16] Wei S C, Chen S, Wei B X, et al. Estrus synchronization schemes and application efficacies in anestrus lanzhou fat-tailed ewes[J]. Journal of Applied Animal Research, 2016, 44(1): 466–473.
- [17] Duarte A, Araujo V R, Chaves R N, et al. Bovine dominant follicular fluid promotes the *in vitro* development of goat preantral follicles[J]. Reproduction Fertility and Development, 2012, 24(3): 490–500.
- [18] Guler A, Poulin N, Mermillod P, et al. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes[J]. Theriogenology, 2000, 54(2): 209–218.
- [19] Gill A, Jamnongjit M, Hammes S R. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription; a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis[J]. Molecular Endocrinology, 2004, 18(1): 97–104.
- [20] Tsafiri A, Cao X M, Vaknin K M, et al. Is meiosis activating sterol (MAS) an obligatory mediator of meiotic resumption in mammals[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 187(1/2): 197–204.
- [21] Germoush M O, Al-Mutary M G, Al-Himaidi A R, et al. Effects of follicular fluid on developmental competence and gene expression of *in vitro* fertilized sheep embryos[J]. Pakistan Journal of Zoology, 2018, 50(4): 1267–1277.
- [22] Richani D, Gilchrist R B. The epidermal growth factor network; role in oocyte growth, maturation and developmental competence[J]. Human Reproduction Update, 2018, 24(1): 1–14.
- [23] Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, et al. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor[J]. Theriogenology, 2000, 54(5): 787–797.
- [24] Ni H M, Sheng X H, Cui X, et al. Epidermal growth factor-mediated mitogen-activated protein kinase3/1 pathway is conducive to *in vitro* maturation of sheep oocytes[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120418.
- [25] 尹耀学, 苏友强. LH/EGF 诱导 ICR 小鼠窦状卵泡卵母细胞体外成熟与排卵的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017(9): 1163–1167.
- [26] 徐梦思, 黄涛, 马亮, 等. 猪 *TGFβ1* 和 *TGFβRI* 基因多态性与产活仔数的关联分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 38–41.
- [27] 陈静波, 张响英, 金彩莲, 等. 转化生长因子 β 对体外成熟猪卵母细胞成熟率的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(22): 176–178.
- [28] 赵海波, 罗丽兰, 刘义. 胰岛素样生长因子-I 对卵母细胞成熟度、受精力及卵裂力的影响[J]. 中华妇产科杂志, 1997, 32(10): 586–588.
- [29] Xia P, Tekpetey F R, Armstrong D T. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. [J]. Molecular Reproduction & Development, 1994, 38(4): 373–379.
- [30] 赵晓娥, 李向臣, 高立功, 等. 山羊卵母细胞的体外成熟研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(9): 1–3, 16.
- [31] Bezerra M E, Barberino R S, Menezes V G, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes primordial follicle growth and reduces DNA fragmentation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling pathway [J]. Reproduction Fertility and Development, 2018, 30(11): 1503–1513.
- [32] Sirois M G, Edelman E R. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1997, 272(6): 2746–2756.
- [33] 宋凯, 曹忻, 石国庆, 等. 绵羊卵母细胞不同体外成熟培养液添加血管内皮生长因子效果研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(1): 402–407.
- [34] Araújo V R, da Silva G M, Figueiredo J R. Only VEGF is necessary to stimulate the meiotic competence of caprine oocytes during *in vitro* maturation[J]. Ciência Animal, 2017, 27(1): 31–40.
- [35] Johnson M H, Nasresfahani M H. Radical solutions and cultural problems; could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? [J]. Bioessays, 1994, 16(1): 31–38.
- [36] Sandal A İ, Özdaş Ö B. Modifiye TCM-199 medyumunda olgunlaştırılarak *in vitro* üretilen sıçır embriyolarının dondurulması [D]. Istanbul, Turkey: Istanbul University, 2012.
- [37] Issels R D, Nagele A, Eckert K G, et al. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and *N*-acetylcysteine [J]. Biochemical pharmacology, 1988, 37(5): 881–888.
- [38] 郭洪, 万鹏程, 石国庆. 成熟液添加半胱胺对羔羊卵母细胞体外成熟、受精和发育的影响[C]//中国畜牧兽医学动物繁殖学分会第十六届学术研讨会论文集. 哈尔滨, 2012.
- [39] ferrell J E. *Xenopus* oocyte maturation; new lessons from a good egg [J]. BioEssays, 1999, 21(10): 833–842.
- [40] 王正朝, 石放雄. PDE4 与 cAMP 信号区域化[J]. 科学通报, 2006, 51(22): 2577–2586.
- [41] 石放雄. PI-3K/Akt 通路的下游因子磷酸二酯酶 3B 及其临床研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2007, 29(6): 800–804.
- [42] Tsafiri A, Chun S Y, Zhang R, et al. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells; studies using selective phosphodiesterase inhibitors[J]. Developmental biology, 1996, 178(2): 393–402.